

VITOR EDUARDO MANDELLI

*O USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
(PRP) NA CIRURGIA ORTOPÉDICA*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de Médico Veterinário

Orientador: Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Botucatu 2010

VITOR EDUARDO MANDELLI

*O USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
(PRP) NA CIRURGIA ORTOPÉDICA*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de Médico Veterinário

Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais

Orientador: Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Coordenador de Estágios: Prof^a. Ass. Dr^a. Vânia Maria Vasconcelos Machado

Botucatu 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a quem antes dedicou sua vida e trabalho para que eu chegasse até aqui: Aos meus pais.

MANDELLI, VITOR EDUARDO. *O uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) na cirurgia ortopédica*. Botucatu, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é estudar uma técnica ainda pouco difundida na Medicina Veterinária brasileira, que é o uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) especificamente na área ortopédica de pequenos animais, abordando o conceito de PRP, o porquê do seu uso na ortopedia, seu método de obtenção e aplicação, suas indicações, vantagens e desvantagens, bem como avaliar os resultados obtidos através da utilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tanto na Medicina Humana quanto na Medicina Veterinária.

Além disso, visa estabelecer a viabilidade desta técnica para seu emprego na cirurgia ortopédica veterinária, em especial como um adjuvante na consolidação de fraturas.

Palavras-chave: Plaquetas, Plasma Rico em Plaquetas, Fatores de Crescimento, Osteoindução, Ortopedia.

MANDELLI, VITOR EDUARDO. *The use of Platelet Rich Plasma (PRP) in the orthopedic surgery*. Botucatu, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The aim of this work is to study a still little known technique in the Brazilian Veterinary Medicine, that is the use of the Platelet Rich Plasma (PRP), specifically in the small animals orthopedics, including the concept of PRP, why its use in orthopedics, its production method and application, its indications, vantages and disadvantages, and also evaluate the results achieved through the use of PRP both in Human Medicine as in Veterinary Medicine.

Moreover, it aims to establish the feasibility of this technique for its use in veterinary orthopedic surgery, especially as an adjunct in fracture repair.

Keywords: Platelets, Platelet-Rich Plasma, Growth Factors, Osteoinduction, Orthopedics.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
SUMÁRIO	03
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	04
1. INTRODUÇÃO	05
2. REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1 PLAQUETAS	06
2.1.1. <i>ESTRUTURA</i>	06
2.1.2. <i>FUNÇÕES</i>	06
2.1.3. <i>FATORES DE CRESCIMENTO</i>	07
2.2. CICATRIZAÇÃO ÓSSEA	07
2.3. PRP	08
2.3.1. <i>MÉTODO DE OBTENÇÃO</i>	09
2.3.2. <i>AÇÃO</i>	11
2.3.3. <i>INDICAÇÕES</i>	11
2.3.4. <i>RESULTADOS</i>	11
2.3.5. <i>VANTAGENS E DESVANTAGENS</i>	12
3. CONCLUSÃO	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
ANEXOS	15

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras

1. Figura 1 – Plaqueta e seus componentes intracelulares. Anitua 2004 (adaptado). 19

Lista de Tabelas

1. Tabela 1 – Fatores de Crescimento relacionados ao reparo ósseo. Pagliosa 2007 (adaptado de Millis, 1999)..... 19

1. Introdução

A ortopedia em Medicina Veterinária é uma área muito bem desenvolvida e estudada, principalmente no que se diz respeito a fraturas em pequenos animais. É notável o surgimento de novas técnicas e avanços para a melhor resposta frente a uma perda de integridade óssea. Dessa maneira, por volta da década de 70 surgiu a idéia do uso das plaquetas como um meio de estimular a reparação tecidual (não apenas ossos, mas também ligamentos e tendões) e não só na área ortopédica como também na odontologia e até na oftalmologia (ANITUA, 2004).

As plaquetas são componentes sangüíneos muitos conhecidos por seu papel hemostático no organismo, porém suas funções não se limitam apenas a isso, e atualmente estão sendo pesquisadas e descobertas novas utilidades para as mesmas, como a reparação de tecidos lesados. Visando com isso, o aperfeiçoamento de técnicas terapêuticas e melhores resultados no tratamento de lesões. (PAGLIOSA, 2007).

2. Revisão de literatura

2.1 Plaquetas

Para entender como as plaquetas podem ser úteis na consolidação de uma fratura é preciso antes ter em mente o que é uma plaqueta, qual sua estrutura e suas funções no organismo, e é necessário ainda, entender a fisiologia de uma consolidação óssea normal.

2.1.1 Estrutura

A plaqueta é uma célula sangüínea formada através da fragmentação do citoplasma de megacariócitos (uma célula gigante e multinucleada presente na medula óssea). São células muito pequenas (cerca de 1,5 a 2,5 micrômetros de diâmetro) e são anucleadas. As plaquetas são formadas por organelas comuns à maioria das células, como a mitocôndria e o lisossomo, possuem RNA e, além disso, possuem em seu citoplasma corpos densos (como Adenosina Trifosfato – ATP, Adenosina Difosfato – ADP, serotonina, entre outros) e α -grânulos (como fibrinogênio, fator V, Fator de Von Willebrand e fatores de crescimento). (ANITUA, 2004).

2.1.2 Funções

A hemostasia realizada pelas plaquetas já foi muito estudada e hoje se sabe que após a lesão e exposição do subendotélio as plaquetas são ativadas e se aderem ao sítio da lesão através da interação (mediada pelo Fator de Von Willebrand proveniente do subendotélio exposto) entre a glicoproteína presente na membrana plaquetária e os receptores de colágeno no vaso sangüíneo lesado. A partir dessa fase de adesão outras plaquetas serão atraídas para o local da lesão, onde, através de substâncias liberadas pelo endotélio lesado ou até mesmo pelas próprias plaquetas ativadas, vão formar um “plug tampão” ou trombo que será posteriormente estabilizado pela ação da trombina. (ANITUA, 2004).

Já a ação de reparação tecidual das plaquetas é realizada principalmente por seus fatores mitogênicos que estão armazenados nos alfa-grânulos. Cada uma dessas proteínas tem uma atividade biológica específica, sendo que neste trabalho serão estudados apenas os fatores de crescimento. (ANITUA, 2004).

2.1.3 Fatores de Crescimento

São vários os fatores de crescimento de origem plaquetária, tais como o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidermal Derivado de Plaquetas (EGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico 2 (FGF-2). Cada um desses fatores age de uma maneira específica no processo reparativo, sendo que os principais fatores de crescimento plaquetários no processo de cicatrização óssea são o PDGF e o TGF- β já que são eles que vão estimular a diferenciação das células mesenquimais em condroblastos e osteoblastos. (PAGLIOSA, 2007).

2.2 Cicatrização Óssea

Após uma fratura e a perda da integridade óssea, inicia-se o processo de reparo e cicatrização do osso, também chamado de consolidação. Esse processo é uma resposta fisiológica e que tem um tempo de duração dependente de vários fatores. A cicatrização óssea depende principalmente do periósteo (que é uma membrana de tecido conjuntivo que envolve os ossos) por este ser uma importante fonte de células precursoras que irão se diferenciar em condroblastos e em osteoblastos, no entanto a medula óssea, o endósteo e pequenos vasos sanguíneos também podem ser fonte de células precursoras. (PIERMATTEI, FLO & DECAMP, 2009).

O processo de reparação do tecido ósseo lesado pode ser dividido em 3 fases: fase reativa, fase reparativa e fase de remodelação. A fase reativa é compreendida por uma vasoconstricção dos vasos adjacentes ao foco de fratura, impedindo maior sangramento e possibilitando a formação de um

coágulo; dentro deste coágulo ocorre a degranulação das plaquetas e a liberação de substâncias, entre elas os fatores de crescimento, formando um microambiente e possibilitando a quimiotaxia de células inflamatórias e a ativação de células progenitoras locais. Após a ativação das células progenitoras e a invasão do coágulo por estas, o TFG- β e o PDGF irão agir estimulando a angiogênese e a mitose e diferenciação das mesmas em condroblastos, fibroblastos e osteoblastos (dependendo das condições do osso e da fratura, bem como, da estabilidade do foco e da tensão de oxigênio no local). Após isso, há replicação de fibroblastos dentro do coágulo formando um tecido de granulação, que dará origem a cartilagem hialina adjacente ao foco. Depois de formado o tecido de granulação, inicia-se a fase reparativa, na qual as células periosteais próximas ao foco de fratura se diferenciam em condroblastos e formam cartilagem hialina; e as células periosteais distais ao foco de fratura que se tornam osteoblastos, formadores de tecido ósseo. A partir dessa formação de novos tecidos, ocorre o crescimento dos mesmos até alcançarem o tecido homólogo do outro lado do foco da fratura, formando um novo tecido, heterogêneo, chamado de calo ósseo. A próxima etapa da consolidação é a substituição da cartilagem hialina por cartilagem, e do tecido ósseo, por osso lamelar (processo chamado de ossificação endocondral); e esse processo se inicia logo após a matriz de colágeno se tornar mineralizada, aí então a matriz é penetrada por túneis concêntricos, cada um contendo um ósteon, alguns osteoclastos, um microvaso muitos osteoblastos: esses osteoblastos vão formar um novo osso lamelar sobre superfície exposta da matriz mineralizada. Então, após esse processo de formação de um osso de estrutura normal, ocorrerá um processo demorado de remodelamento ósseo, fazendo com que o osso fraturado volte a ter a forma mais parecida possível com a do osso normal. (DENNY & BUTTERWORTH, 2006).

2.3 PRP

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) há muito tempo vem sendo um assunto de interesse e conseqüentemente de muito estudo na área médica. O PRP tem obtido resultados importantes na Medicina Humana, principalmente nas áreas

de odontologia e ortopedia, onde tem sido usado com sucesso no tratamento das lesões de atletas, diminuindo consideravelmente o tempo de recuperação e até mesmo evitando a necessidade de um eventual procedimento cirúrgico. Como exemplos do uso do PRP na Medicina Humana podem ser citados os atletas, como muitos jogadores de futebol, que após sofrerem lesões (desde lesões musculares e ligamentares até fraturas), recorreram para este tipo de terapia para antecipar o retorno aos gramados; tem-se notícia também do uso do PRP por pessoas do ramo artístico, sendo que em um dos casos, foi usado com sucesso no tratamento de tendinopatia crônica. Esses resultados animadores têm atraído a atenção da Medicina Veterinária, gerando uma onda de pesquisas para adaptar e estabelecer a viabilidade do seu uso em diversas áreas de veterinária.

2.3.1 Método de Obtenção

O método de obtenção do PRP é relativamente simples e não necessita de muitos equipamentos. Baseia-se em coletar uma amostra de 30 a 60 mL (mililitros) de sangue do próprio indivíduo que irá receber a aplicação (já que se trata de uma técnica autóloga). A realização da coleta deve ser feita de forma asséptica e deve-se usar uma agulha de grande calibre para evitar a ativação precoce das plaquetas. A amostra deverá ser colocada em um recipiente com citrato (um anticoagulante quelante de cálcio), uma vez que o PRP não pode ser obtido de amostras de sangue coagulado e plaquetas fazem parte do coágulo, e também não pode ser obtido do soro porque este é a fração que fica após a retirada das células sangüíneas e das proteínas coagulantes. Tendo sido realizada a coleta, o próximo passo é a centrifugação do sangue que deve ser feita na rotação adequada (que vai variar de acordo com o método utilizado, e que serão estudados posteriormente) para proporcionar uma boa separação celular e evitar danos às membranas das plaquetas. O processo de centrifugação pode ocorrer de duas maneiras: realizando-se uma única centrifugação (processo de uma etapa) ou duas (processo de duas etapas). De ambas as formas são possíveis conseguir uma concentração elevada de plaquetas no plasma; embora o número ideal ainda não tenha sido bem definido, acredita-se que concentrações com $1.000.000\mu\text{l}^{-1}$ (um milhão de

plaquetas por microlitro), em uma alíquota padrão de 5 mL, são capazes de proporcionar bons resultados. (PAGLIOSA, 2007)

O processo de uma etapa é realizado através de apenas uma centrifugação do sangue, submetendo-o a uma rotação de 5600rpm (rotações por minuto), durante seis minutos. Ao final desse processo serão obtidas três frações do sangue no tubo; a fração superior contém o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) que deve ser descartada, a fração mediana contém o PRP e a fração inferior contém as células vermelhas. Após o descarte do PPP é feita a separação do PRP juntamente com 1 a 2 mm (milímetros) da fração que contém os eritrócitos para posterior aplicação. (PAGLIOSA, 2007).

O processo de duas etapas consiste em uma primeira centrifugação a 160g (sendo “g” a aceleração, em metros por segundo por segundo; no caso aproximadamente 1570 m/s^2) durante vinte minutos, separando-se o plasma dos eritrócitos. Depois disso, o plasma sobrenadante, juntamente com seis milímetros da fração vermelha, é centrifugado novamente a uma rotação de 400g (aproximadamente 3920 m/s^2), por mais quinze minutos. Ao final desse processo serão formadas duas frações no tubo, a superior (de coloração amarelada) é descartada e a inferior é reservada para utilização. (PAGLIOSA, 2007).

Para que o PRP possa ser aplicado no local desejado, este precisa estar coagulado, o que permite a aderência ao local desejado e ainda leva à ativação plaquetária (liberação dos fatores de crescimento dos α -grânulos); e após essa ativação, aproximadamente 70% dos fatores de crescimento são liberados dentro de 10 minutos e quase 100% deles são liberados dentro de uma hora. Existem alguns métodos para promover a ativação de maneira mais prolongada; um deles é o uso de trombina bovina, no entanto, estudos indicam que o uso desta pode levar a complicações, como a formação de anticorpos contra a trombina bovina, e conseqüentemente, levar a uma coagulopatia imunomediada. Outro método é a adição de cloridrato de cálcio (CaCl_2) a 10% durante a segunda etapa da centrifugação, formando assim uma matriz densa de fibrina, onde as plaquetas intactas vão se prender e ser liberadas aos poucos durante até sete dias. Dessa maneira, o PRP é inoculado no local

desejado, neste caso, no caso no foco da fratura, onde começa a agir. (FOSTER, 2009).

2.3.2 Ação

A ação do PRP é baseada na fisiologia normal da osteogênese. As plaquetas, primeiramente agem na formação de um coágulo no local de lesão (através dos mecanismos de hemostasia já discutidos neste trabalho anteriormente), e dentro desse coágulo, em contato com a matriz óssea exposta, as plaquetas irão degranular e liberar os fatores de crescimento presentes em seus α -grânulos. Assim que liberados, os fatores de crescimento começam a agir (cada um com sua ação específica) mediando a quimiotaxia de novas células para o local desejado, e principalmente, estimulando a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco) em condroblastos, fibroblastos e osteoblastos (função desempenhada principalmente pelos fatores PDGF e TGF- β). (PAGLIOSA, 2007; NIKOLIDAKIS, 2008).

2.3.3 Indicações

Uma vez determinado o método de obtenção e o mecanismo de ação do PRP frente a uma lesão, surgiram pesquisas para se identificar em que situações e em que tecidos o uso do Plasma Rico em Plaquetas seria viável. Atualmente, sabe-se que o PRP é usado com sucesso em cirurgias odontológicas (principalmente em cirurgias reconstrutivas e em implantes dentários) e tem apresentado resultados satisfatórios na cirurgia ortopédica, em casos de reconstrução óssea. Além disso, o PRP é muito útil na reparação de tecidos moles lesionados e, por essa característica, é indicado em plásticas faciais, cirurgia cosmética, úlceras de pele, cirurgias oftálmicas (úlceras de retina) e em lesões tendíneas, ligamentares e cartilaginosas. (ANITUA, 2004).

2.3.4 Resultados

Apesar do grande potencial teórico do PRP, os resultados práticos do seu uso ainda deixam algumas dúvidas. Trabalhos e estudos feitos têm mostrado bons resultados no que se diz respeito a tempo de consolidação e tempo de recuperação (principalmente na odontologia e no tratamento de lesão de

tecidos moles em Medicina Humana); no entanto, outros trabalhos indicam nenhuma alteração benéfica com o uso do PRP. Alguns autores creditam estes resultados controversos à falta de padronização do método de obtenção e conseqüentemente à variação na concentração de plaquetas nas amostras. Faltam trabalhos mais bem elaborados, que determinem uma metodologia precisa e uma concentração ideal de plaquetas no plasma, faltam ainda trabalhos com um número maior de casos e com um grupo controle adequado, para que a eficácia do PRP possa ser comparada e comprovada.

2.3.5 Vantagens e Desvantagens

A principal vantagem do uso do PRP como um agente indutor é ser uma técnica autóloga, ou seja, o material que será aplicado no paciente pertence a ele mesmo; dessa forma, não há risco de uma reação imunológica. Apesar de tratar-se de um material disponível, carece ainda de metodologia mais apurada, além de necessitar de laboratórios adequados para seu processamento.

Por outro lado, esta é uma técnica ainda pouco estudada e que possui resultados controversos, assim sendo, deve-se ser criterioso e ter cautela ao se optar pelo uso do PRP, mesmo que este tenha tido seu uso liberado no Brasil.

3. Conclusão

Tendo estudado os fundamentos teóricos nos quais se baseiam a técnica do Plasma Rico em Plaquetas e avaliando-se os resultados obtidos por meio do uso deste na cirurgia ortopédica, principalmente em cirurgias de reconstrução óssea, torna-se difícil e precoce estabelecer a viabilidade de seu uso na Medicina Veterinária já que a técnica exata não foi padronizada e, com isso, surgem resultados variados. Por ser uma alternativa simples, e com um grande potencial como um adjuvante na consolidação de fraturas, deve-se realizar novos estudos e experimentos em torno do PRP para que, caso sua eficácia se torne irrefutável, dessa maneira possa-se utilizá-lo com mais frequência na rotina cirúrgica veterinária do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANITUA. E., et al. Autologus Platelets as a Source of Proteins for Healing and Tissue Regeneration. Review Articles, Thromb Haemost, v.91, p. 4-15. 2004.
2. CAMARGO. P. M., et al. Platelet-Rich Plasma and Bovine Porous Bone Mineral Combined with Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Intrabony Defects in Humans. Journal of Periodontal Research, v. 37, p. 300-306. 2002.
3. DENNY. H. R.; BUTTERWORTH S. J., **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4ªed, Roca, 2006. 504pag. (seção 1, pag. 8-10).
4. FOSTER. T. E., et al. Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. AM J Sports Med, 37, p. 2099-2101. 2009.
5. NIKOLIDAKIS. D., et al. The Biology of Platelet-Rich Plasma and Its Application in Oral Surgery: Literature Review. Tissue Engineering. v.14, p. 249-258. 2008.
6. PAGLIOSA. G. M., et al. Considerações Sobre a Obtenção e o Uso do Plasma Rico em Plaquetas e das Células Mesenquimais Indiferenciadas em Enxertos Ósseos. Ciência Rural, v. 37, n.4, p. 1202-1205. 2007
7. PIERMATTEI D. L.; FLO G.; DeCAMP C. E., **Ortopedia e Tratamento de Fraturas em Pequenos Animais**. 4ªed., Manole, 2009, 896p. (cap. 2, pag. 30-32).

ANEXOS

1. FIGURA 1 – Plaqueta e seus componentes intracelulares. Anitua 2004 (adaptado).

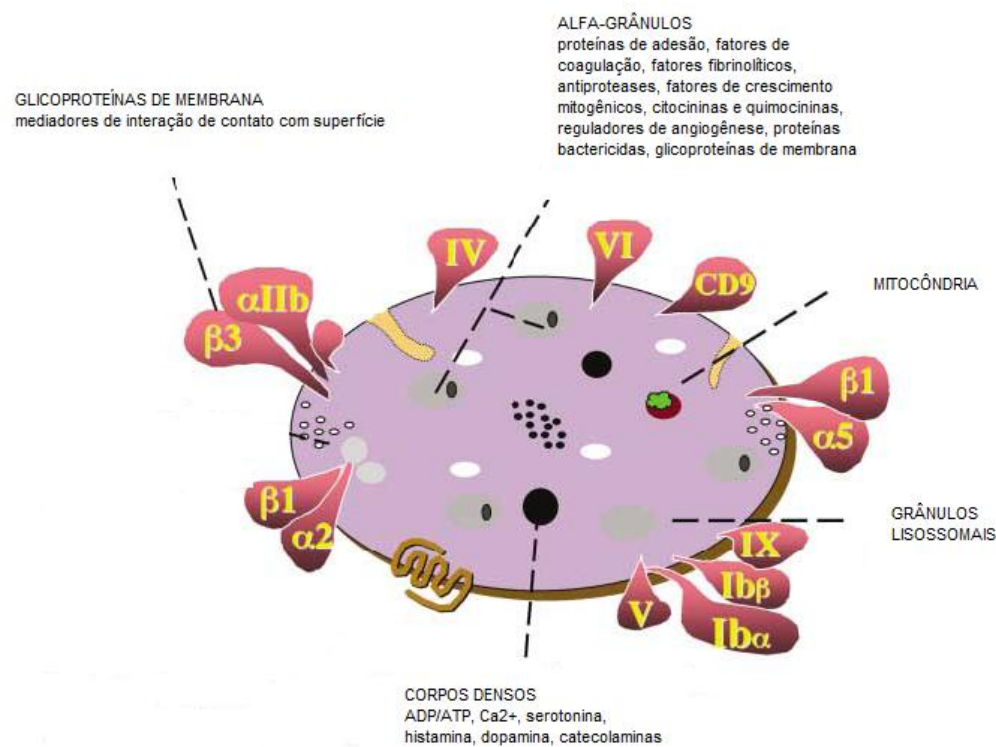


Tabela 1 – Fatores de Crescimento relacionados ao reparo ósseo. Pagliosa 2007 (adaptado de Millis, 1999).

Tabela 1 - Fatores de crescimento relacionados ao reparo ósseo.

Fator de Crescimento	Fonte	Funções
Derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, macrófagos, endotélio, fibroblastos	Quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos, proliferação fibroblástica, angiogênese, mitose de fibroblastos e osteoblastos
Fibroblástico (FGF)	Endotélio, macrófagos, osso, condrócitos	Mitose de células endoteliais, fibroblastos, condrócitos e osteoblastos, angiogênese, deposição de colágeno
Epidermal (EGF)	Plaquetas e outros tecidos	Quimiotaxia para células endoteliais e fibroblastos, angiogênese e estímulo à atividade da collagenase
Transformador β (TGF β)	Plaquetas, macrófagos, condrócitos, rins, matriz óssea, osteoblastos	Mitogênico para fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, quimiotaxia, síntese de colágeno e função osteoblástica, síntese de outros fatores de crescimento, diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas
Proteína óssea morfogênica (BMP)	Osteoblastos, matriz óssea	Diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos e osteoblastos, quimiotaxia de células mesenquimais
Somatotrofina (STH) [GH]	Pituitária anterior	Anabolismo, crescimento das epífises, proliferação de osteoblastos, produção de IFG-I
Semelhante à insulina (IGF-I)	Fígado, osteoblastos, condroblastos, matriz óssea, fibroblastos	Síntese de colágeno e proteoglicanos, proliferação de fibroblastos e osteoblastos

(Fonte: Adaptado de MILLIS, 1999).